

主 論 文

Two Arginine Residues in the COOH-Terminal of Human β -Defensin-3 Constitute An Essential Motif for Antimicrobial Activity and IL-6 Production

(Human β -defensin-3 の抗菌活性と IL-6 産生には C 末端の 2 つの特異的なアルギニン残基が非常に重要である)

[緒言]

ディフェンシン(defensin)は陽性に荷電した小分子量の抗菌ペプチドであり、真菌から、植物、無脊椎動物、脊椎動物にいたる生命体の自然免疫において重要な役割を担っている。defensin は共通して、6 つのシステイン残基からなる 3 つのジスルフィド結合を有しており、これらの結合は α ヘリックスと三本鎖の逆平行 β シートからなる defensin の三次構造において非常に重要な役割を果たしている。

ヒトの皮膚においては、これまでに 4 種の Human β -defensin (HBD-1、-2、-3、-4) が同定されている。HBD-3 は、HBD-2 と同様に、ヒトの乾癬皮疹部の鱗屑から単離された。HBD-1、-2、-4 は、*Escherichia coli* (*E. coli*)や *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)などのグラム陰性菌優位に強い抗菌活性を呈するが、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)や *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)などのグラム陽性菌に対してはほとんど、もしくは全く抗菌活性を持たないと報告されている。それらと比較して、HBD-3 はグラム陽性および陰性菌の両者に対して、はるかに低い濃度で高い抗菌活性を有する。さらに、HBD-3 は塩の存在下でもその活性を維持することも知られている。

抗菌活性に加えて、HBD-3 は、ヒト表皮角化細胞にて IL-6、IL-10、IP-10、IL-18 を含む proinflammatory サイトカインを誘導することも報告されている。

HBD-3 の持つ生理活性の重要な因子として、我々は HBD-3 特有の構造である、C 末端に存在する 2 つのアルギニン (R) 残基に着目し、HBD-3 の C 末端の 2 つの R 残基を除いたペプチド (desR HBD-3)、および、desR HBD-3 の N 末端に R 残基 2 つを付与し、総電荷を HBD-3 と同一にしたペプチド (NRR HBD-3) の、2 つの変異ペプチドを作成した (Fig 1A, 1B)。我々は、HBD-3 の抗菌活性と塩抵抗性を調べ、その結果を HBD-2、desR HBD-3、NRR HBD-3 と比較した。また、それぞれのペプチドによる、培養ヒト表皮角化細胞からの IL-6 産生誘導についても検討した。

[材料と方法]

desR HBD-3 および NRR HBD-3 の発現と精製

乾癬皮膚から抽出・冷凍保存したトータル RNA をテンプレートにして、逆転写 PCR を行い、成熟 HBD-3 ペプチドをコードする cDNA を得た。PCR を用いて変異導入およびペ

プチドシーケンスの 5'末端に FXa 認識領域も付与し、desR HBD-3 cDNA を得た。

PCR で得られた DNA 断片を pCR2.1-TOPO (Invitrogen) にクローニングした。このベクターをさらに EcoRI と SalI で切断・ゲル精製し、同様に切断・精製した pET-28a プラスミドにサブクローニングし、BL21 (DE3) Codon Plus 株(Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, CA, USA)をトランスフォームすることで、N 末端に His6 タグを持った標的ペプチド発現系を構築した。

次にこの desR HBD-3 コンストラクトをテンプレートにして、NRR HBD-3 コンストラクトを作製した。得られた NRR HBD-3 フラグメントは desR HBD-3 の場合と同じく最終的に pET-28a にクローニングし、BL21 (DE3) Codon Plus 株をトランスフォームした。変異についてはすべて DNA シーケンスを行って確認した。

トランスフォーム後の BL21 株を、TB 培地で培養、0.2 mM IPTG を加え、6x-His タグフュージョンプロテインを発現させた。菌体を回収、溶解後、Ni-NTA レジンカラムにて 6x-His タグフュージョンプロテインを抽出、C18 RP-HPLC にて脱塩後、Factor Xa にて 6x-His タグをフュージョンプロテインより切断し、再度 C18 RP-HPLC を行い、各 HBD-3 変異ペプチドを抽出した。変異ペプチドの N 末端配列をシーケンサーで確認し、合成 HBD-2, HBD-3 (ペプチド研究所, 大阪)とともに、SDS-PAGE を行った(Fig 1C)。

抗菌活性

S. aureus FDA209P 株と *P. aeruginosa* NBRC12582 株の提供を Dr. Mineshiba より受け、HBD-2, -3, desR HBD-3, NRR HBD-3 の抗菌活性を測定した。また、それぞれ 3 種の *S. aureus* と *P. aeruginosa* 野生株についても同様に抗菌活性を測定した。

培養細胞実験

正常ヒト培養表皮角化細胞(NHEKs)をサブコンフルエントまで培養し、HBD-2, -3, desR HBD-3, NRR HBD-3 を濃度 30 µg/ml で添加し、刺激を行った。

リアルタイム PCR

各ペプチド刺激 12 時間後の NHEKs から tRNA を抽出して逆転写し cDNA を得た。この cDNA をリアルタイム定量 PCR (qPCR) のテンプレートとして用い、IL-6 遺伝子の発現を解析した。

ELISA

HBD-2, -3, desR HBD-3, NRR HBD-3 で各 30 µg/ml、48 時間刺激した NHEKs および刺激しなかった NHEKs からの IL-6 分泌を ELISA (Quantikine Human IL-6 Immunoassay, R&D Systems) により測定した。

[結果]

S. aureus FDA209P および *P. aeruginosa* NBRC12582 に対する抗菌活性

S. aureus FDA209P に対して、HBD-2 は 20 µg/ml まで抗菌活性を全く認めなかったが、HBD-3 は 2.0 µg/ml にて、強い抗菌活性を呈した。desR HBD-3 は HBD-3 に比して MIC 値は増大した (5~10 µg/ml)。予想に反して、同等の陽性電荷をもつ NRR HBD-3 も、MIC 値は desR HBD-3 とほぼ変わらなかった。全てのペプチドが、*P. aeruginosa* NBRC12582 に対して強い抗菌活性を持ち、その MIC は 5µg/ml 未満であった(Fig.2A,B)。

S. aureus FDA209P および *P. aeruginosa* NBRC12582 に対する抗菌活性の塩抵抗性

HBD-2, -3, desR HBD-3, NRR HBD-3 の濃度を 10 µg/ml に固定し、NaCl 存在下で *S. aureus* FDA209P および *P. aeruginosa* NBRC12582 に対する抗菌活性を検討した。*S. aureus* FDA209P に対しては、HBD-3 は生理的以上の高濃度まで、NaCl 存在下でも強い抗菌活性を呈した。desR HBD-3 と NRR HBD-3 は、NaCl が 50µM 存在すると抗菌活性が減弱した。HBD-2 は NaCl が存在しない状況でさえも、抗菌活性は認められなかった。*P. aeruginosa* NBRC12582 に対しては、HBD-3 と NRR HBD-3 は、NaCl 濃度 250mM まで抗菌活性を保ったが、desR HBD-3 と HBD-2 では、NaCl 濃度がそれぞれ 150mM、50mM までのみ抗菌活性を維持しているにとどまった(Fig.2C,D)。

野生株 *S. aureus* および 野生株 *P. aeruginosa* に対する抗菌活性

それぞれ 3 種の野生株 *S. aureus* および *P. aeruginosa* に対する抗菌活性も確認した。野生株の *S. aureus* に対して、HBD-3 は強い抗菌活性を呈したが、HBD-2 と同様に、desR HBD-3 は抗菌活性を失った。NRR HBD-3 は、HBD-3 に比すと劣るものの、抗菌活性は認められた。HBD-3 と NRR HBD-3 の MIC は、それぞれ 2~4 µg/ml、10~20 µg/ml であった(Fig.3A)。

一方で、野生株の *P. aeruginosa* に対しては、いずれのペプチドも抗菌活性を認めた。HBD-2 と HBD-3 の MIC はそれぞれ、4~10 µg/ml、5µg/ml であった。desR HBD-3 と NRR HBD-3 の MIC は少し劣り、10~20µg/ml であった。この値は、*P. aeruginosa* NBRC12582 に対する HBD-2、-3 の MIC と同等であった(Fig.3B)。

HBD-2、-3 および変異ペプチドで表皮角化細胞を刺激した際の IL-6 遺伝子の発現

HBD-3 の C 末端に存在する 2 つの R 残基の役割を確認するために、正常ヒト表皮角化細胞を刺激して IL-6 を産生させ、real-time 定量 PCR で IL-6 の遺伝子発現を調べた。HBD-3 は、コントロールに比して 5.8×10^3 倍以上 IL-6 の mRNA 発現を呈した。HBD-2 は IL-6 の mRNA 発現は増強しなかった。desR HBD-3 と NRR HBD-3 も IL-6 の mRNA 発現を高めるが、HBD-3 のおよそ 0.1%の効果にとどまった(Fig.4A)。

HBD-2、-3 および変異ペプチドで表皮角化細胞を刺激した際の IL-6 分泌

それぞれのペプチドで表皮角化細胞を 48 時間刺激し、上清中の IL-6 量を ELISA kit で確認したところ、HBD-3 は IL-6 産生を最も強く誘導した。desR HBD-3 と NRR HBD-3 は、IL-6 の産生が HBD-3 に比してかなり劣っていた。これより、IL-6 分泌能は総陽性荷電だけでなく、R 残基の位置にも依存することが示唆された(Fig.4B)。

[考察]

ディフェンシンファミリーの中でも、特に HBD-3 は幅広い抗菌活性をもち、高濃度の NaCl 存在下においても、強い抗菌活性を維持する。そのため、HBD-3 は多剤耐性菌に対する新しい薬剤として期待されており、より効果的な抗菌作用を持つ変異ペプチド生成を可能にするためにも、HBD-3 の抗菌メカニズムと、それに関わるアミノ酸配列を解明することは非常に重要である。我々は、他の human β -defensin は有さない、HBD-3 特有の C 末端に存在する 2 つの R 残基が、HBD-3 の活性に重要であるとの仮説に基づいて 2 つの変異ペプチドをデザインした。我々の仮説どおり、この 2 つの R 残基を除いた desR HBD-3 は、*S. aureus* に対して強い抗菌活性は持たず、*P. aeruginosa* に対してもごくわずかな抗菌活性しか示さなかった。

興味深いことに、2 つの R 残基を C 末端から N 末端に移動させた、HBD-3 と等しい電荷を持つ NRR HBD-3 においても、どちらの菌種に対しても抗菌活性は減弱した。NRR HBD-3 は、*P. aeruginosa* に対して、生理的濃度を超える NaCl 濃度下でのみ、desR HBD-3 より強い抗菌活性を示した。

HBD-3 には、2 つの陽性電荷 patch が存在する：Patch1 は R14、R17、K26、R42、R43、K44、K45 を含み、Patch2 は K32、K36、R38、K39 を含む。我々の実験では、patch 1 に存在する R42、R43 を除くことにより HBD-3 の抗菌活性は減弱し、これら 2 つの R 残基を N 末端に転位しても、抗菌活性は回復しないということが示唆された。さらに、desR HBD-3 は HBD-2 よりも多くの陽性電荷を有しているにも関わらず、*P. aeruginosa* 野生株に対する desR および NRR HBD-3 の抗菌活性は HBD-2 に劣っていた。このことは、*S. aureus* よりも *P. aeruginosa* を死滅させるのに HBD-3 の patch1 が大きな役割を果たすことを示唆しているが、この点はまだ明らかにされておらず、今後の研究課題の 1 つである。

グラム陰性菌に対する HBD-3 の塩抵抗性は、主に総陽性電荷によって制御されている、もしくは、HBD-3 の陽性に帯電された patch1 に加えて、ほかのコンポーネントにも依存する可能性が示された。さらに、NaCl の存在下では、defensin の抗菌メカニズムが、*S. aureus* および *P. aeruginosa* に対して異なるという可能性も考えられた。

HBDs はヒト表皮角化細胞での proinflammatory サイトカイン分泌を促進するなど、抗菌活性のみならず免疫調節作用も有していることから、皮膚科分野でも大きく注目されている。我々は、HBD-3 の 2 つの R 残基の変異がもたらす、ヒト表皮角化細胞から分泌される proinflammatory サイトカインの 1 つである IL-6 産生への影響を調べた。2 つの R 残基

を変異することで、表皮角化細胞からの IL-6 の転写、翻訳レベルでの発現が著明に減少することを確認し、これらの R 残基が炎症過程において、重要な構造である可能性を示した。これらの分析に使用するペプチド濃度は、過去の文献を参照し、30 μ g/ml とした。生体でのペプチド濃度はこれまでに完全には明らかにされていないが、感染や炎症が起こっている上皮系組織での局所濃度は高値であることが示されている。過去の報告では、乾癬皮疹部では、HBD-2 は \sim 157 μ M に及ぶとされている。我々が培養細胞刺激に今回用いたペプチド濃度（30 μ g/ml は、HBD-3 では 5.8 μ M、HBD-2 では 6.9 μ M に換算される）は、表皮角化細胞におけるペプチドの生理活性の評価に適切であると考えた。

一方で、HBD-3 はマクロファージからは、TNF- α や IL-6 を誘導することではなく、LPS の存在下で TNF- α と IL-6 の蓄積を効果的に抑制するという報告もある。HBD-3 の 2 つの R 残基の変異と、マクロファージにおける免疫調整活性に関する研究も、我々の次の研究課題である。

[結論]

HBD-3 の C 末端に存在する 2 つの R 残基は、塩抵抗性と幅広い抗菌活性に重要であり、HBD-3 がそれらの活性を保つためには、2 つの R 残基が C 末端に存在する必要がある。

また、これらの R 残基は、表皮角化細胞から産生される proinflammatory サイトカインの 1 つである IL-6 の産生にも寄与する。